

***Classificação taxonômica, baseada na
caracterização molecular, das estirpes
de rizóbio recomendadas para as
culturas da soja e do feijoeiro***

*Lígia Maria de O. Chueire, Eliane Bangel, Magda C. Ferreira,
Luciana Grange, Rubens J. Campo, Fábio L. Mostasso,
Diva de S. Andrade, Fábio O. Pedrosa, Mariangela Hungria*

Embrapa

Soja

Comitê de Publicações

Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Presidente

Alexandre José Cattelan

Alexandre Lima Nepomuceno

Flávio Moscardi

Ivania Aparecida Liberatti

Léo Pires Ferreira

Milton Kaster

Norman Neumaier

Odilon Ferreira Saraiva

Tiragem

150 exemplares

Maió/2000

572.545

C559c Chueire, Lúgia Maria de Oliveira

Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro / Lúgia Maria de Oliveira Chueire... [et al.]. - Londrina: Embrapa Soja, 2000.

32p. (Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa, 3).

ISSN 1518-1642

1.Soja-Nitrogênio-Fixação biológica. 2.Feijão-Nitrogênio-Fixação biológica. 3.Rizóbio-Taxonomia. I.Bangel, Eliane. II.Ferreira, Magda Cristiani. III.Gränge, Luciana. IV.Campo, Rubens José. V.Mostasso, Fábio Luís. VI.Andrade, Diva de Souza. VII.Pedrosa, Fábio de Oliveira. VIII.Hungria, Mariangela. IX. Embrapa Soja (Londrina, PR). X.Título. XI. Série.

© Embrapa 2000

Conforme Lei 9.610 de 19.02.98

APRESENTAÇÃO

As diversas pesquisas desenvolvidas, no Brasil, com a simbiose entre bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e a soja fazem com que a cultura seja independente da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Estima-se que essa simbiose resulte em uma economia, para o país, de cerca de 1,5 bilhões de dólares por safra, que deixam de ser gastos com a compra de fertilizantes nitrogenados. Conseqüentemente, a viabilidade econômica do cultivo dessa leguminosa deve-se à ação dessas bactérias, sendo comercializadas, anualmente, cerca de 13 milhões de doses de inoculantes para a cultura da soja. No caso do feijoeiro, a produtividade média nacional, uma das mais baixas do mundo, também pode ser incrementada, a um baixo custo, pelo uso de inoculantes, uma vez que novas estirpes de *Rhizobium*, eficientes e competitivas, foram recentemente identificadas pela pesquisa.

Os avanços nas técnicas de biologia molecular permitem uma melhor definição taxonômica das espécies de bactérias. No Brasil, os inoculantes comerciais devem carregar, exclusivamente, as estirpes recomendadas pela pesquisa, tornando necessária a identificação precisa das mesmas, particularmente para atender às novas demandas da legislação do Mercosul. Desse modo, neste boletim, foram desenvolvidas metodologias que permitiram a classificação taxonômica das estirpes recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro. Essas metodologias poderão ser aplicadas, também, às demais estirpes recomendadas, pela pesquisa, para cerca de 90 leguminosas de grãos, forrageiras, de adubação verde e arbóreas cultivadas no Brasil.

José Renato Bouças Farias

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

SUMÁRIO

<i>I. INTRODUÇÃO</i>	8
1 A fixação biológica do nitrogênio	8
2 Técnicas moleculares utilizadas para a taxonomia de rizóbio	9
3 Classificação taxonômica das estirpes que nodulam a soja e o feijoeiro	11
<i>II. MATERIAL E MÉTODOS</i>	13
1 Estirpes utilizadas	13
2 Perfil de RFLP-PCR da região do 16S rRNA	14
3 Determinação da sequência parcial da região gênica do 16S rRNA	15
<i>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	16
<i>IV. AGRADECIMENTOS</i>	26
<i>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	26

Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro

Lígia Maria de O. Chueire¹, Eliane Bange², Magda C. Ferreira³,
Luciana Grange³, Rubens J. Campo¹, Fábio L. Mostasso³,
Diva de S. Andrade⁴, Fábio O. Pedrosa⁵, Mariangela Hungria¹

RESUMO: As culturas da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) são de grande importância econômica e social para o Brasil e ambas podem ser capazes de suprir suas necessidades do nutriente nitrogênio pela simbiose com bactérias da família *Rhizobiaceae*. Para garantir a maximização do processo biológico, porém, deve-se proceder à inoculação das sementes com estirpes de rizóbio eficientes e competitivas, recomendadas pela pesquisa. No Brasil, são comercializadas, anualmente, cerca de 13 milhões de doses de inoculantes, sendo 99% destinadas à cultura da soja. Neste trabalho, determinou-se a posição taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas comercialmente para as duas culturas por duas técnicas, o RFLP-PCR da região correspondente ao 16S rRNA (região conservada entre bactérias mas suficientemente variável e carregando informações que permitem a determinação das relações filogenéticas entre bactérias) e o sequenciamento parcial dos genes desta região. O sequenciamento parcial permitiu definir que duas das estirpes recomendadas para a cultura da soja, SEMIA 587 e SEMIA 5019, pertencem à espécie *Bradyrhizobium elkanii* e as duas

¹ Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR;

² FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias 579, 90130-060, Porto Alegre, RS;

³ Bolsista da Comunidade Européia;

⁴ IAPAR, Cx. Postal 481, 86001-970, Londrina, PR;

⁵ UFPR-Depto de Bioquímica, Cx. Postal 19046, 81531-990, Curitiba, PR.

outras, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, à espécie *B. japonicum*. As duas estirpes recomendadas para a cultura do feijoeiro, SEMIA 4077 e SEMIA 4080, pertencem à espécie *Rhizobium tropici*. As sequências obtidas para essas estirpes foram depositadas no banco mundial de genes.

I. INTRODUÇÃO

1 A fixação biológica do nitrogênio

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], razão pela qual esta é a leguminosa de maior importância econômica para o país. O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), por sua vez, é largamente consumido no país, representando de 20 a 28% das proteínas ingeridas pela população. Ambas culturas podem obter o nitrogênio (N) necessário ao seu crescimento pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Para isso, diversas bactérias, atualmente classificadas na família *Rhizobiaceae*, se associam a plantas hospedeiras, a maioria da família *Leguminosae*, formando estruturas altamente específicas, os nódulos, onde, através do complexo enzimático da nitrogenase, ocorre a transformação do nitrogênio atmosférico (N₂), que ocupa os espaços porosos do solo, em amônia que, a seguir, é incorporada em esqueletos de carbono, transformada em compostos nitrogenados e transportada para a planta hospedeira (Hungria et al., 1997; Vargas & Hungria, 1997). O mercado de inoculantes de rizóbio, no Brasil, é um dos maiores do mundo, sendo comercializadas, anualmente, cerca de 13 milhões de doses, dos quais 99% para a cultura da soja.

2 Técnicas moleculares utilizadas para a taxonomia de rizóbio

Para a classificação das diversas espécies de rizóbio são, tradicionalmente, utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, enzimáticos e simbióticos, como a taxa de crescimento em meio de cultura contendo manitol, a habilidade de utilizar fontes de carbono e de nodular leguminosas hospedeiras, entre outros (Vincent, 1970; Jordan, 1984). Nos últimos anos, porém, as técnicas de biologia molecular vêm ganhando espaço crescente nos estudos de taxonomia, competitividade e ecologia de rizóbio. Como resultado do nível elevado de informação proporcionado por essas análises, tem-se que, até 1984, os rizóbios eram classificados em dois gêneros e seis espécies (Jordan, 1984) e, hoje, estão definidos seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), mais de 30 espécies e vários biovares (Hungria & Vargas, 1999).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das sequências de nucleotídeos do DNA, em especial à região que codifica o 16S rRNA, considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo suficientemente variável e com uma quantidade de informações capaz de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991), inclusive entre os rizóbios e agrobactérias (Willems & Collins, 1993). Os estudos de filogenia também se beneficiaram, grandemente, pela técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction", ou seja, análise pela reação em cadeia da polimerase), que permite a amplificação de sequências definidas do DNA (Saiki et al., 1988) e que também facilitou as análises da molécula do 16S rRNA de bactérias da família *Rhizobiaceae* (Young et al., 1991; Oyaizu et al., 1992; Yanagi & Yamasato, 1993; McInroy et al., 1999; Segundo et al., 1999). O custo do sequenciamento de genes, porém, é elevado e a técnica não está disponível em todos os laboratórios. Assim, outras variações e combinações de méto-

dos estão sendo utilizadas para verificar a posição taxonômica das bactérias e, algumas, mostram boa correlação com o sequenciamento do 16S rRNA. Destaca-se, entre esses métodos, a reação de PCR associada à metodologia de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism", polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), em geral com ampliações de regiões de genes cromossômicos conservadas, como o 16S rRNA, o 23S rRNA e o espaço intergênico (IGS, "Intergenic Space") entre estas duas regiões; os fragmentos amplificados são digeridos por enzimas de restrição que reconheçam de 4 a 5 bases (Laguerre et al., 1992, 1994, 1996, 1997; Terefework et al., 1998).

Relações genéticas entre as estirpes têm, também, sido investigadas com outras técnicas, como a PCR com "primers" específicos, como as sequências REP ("repetitive extragenic palindromic"), ERIC ("enterobacterial repetitive intergeneric consensus") e BOX, que codificam regiões altamente conservadas e repetidas, normalmente no espaço intergênico (Versalovic et al., 1991; de Bruijn, 1992) e há relatos de utilização desses "primers" em estudos de ecologia, genética e taxonomia de rizóbio (de Bruijn, 1992; Judd et al., 1993; Madrzak et al., 1995; Rossum et al., 1995; Selenska-Pobell et al., 1995; Laguerre et al., 1997; Hungria et al., 1998, 2000; Santos et al., 1999). A PCR com "primers" curtos, normalmente com 10 pares de bases e de sequências aleatórias, também denominada de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) é outra técnica que vem sendo utilizada com os mesmos objetivos (Harrison et al., 1992; Richardson et al., 1995; Selenska-Pobell et al., 1995; Nishi et al., 1996; Young & Chen, 1998; Hungria et al., 2000). Contudo, de um modo geral, essas técnicas detectam grande variabilidade genética, sendo capazes de diferenciar entre estirpes, mas não sendo adequadas para avaliações filogenéticas (Laguerre et al., 1997; Hungria et al., 2000).

3 Classificação taxonômica das estirpes que nodulam a soja e o feijoeiro

De 1932 a 1980 as bactérias que nodulam a soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum* (Fred et al., 1932; Buchanan, 1980), embora fosse salientado que diferiam de um grupo grande de estirpes de rizóbio, por apresentar crescimento lento e reação alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. A partir de 1982, as bactérias da espécie *R. japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium* ("bradus", grego, significando lento), que apresentava uma única espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum* (Buchanan 1980) Jordan, 1982 (Jordan, 1982, 1984). Já a partir da década de 80, porém, vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum*, o que levou, posteriormente, Kuykendall et al. (1992) a sugerirem a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii*. As diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas entre as duas espécies foram compiladas por Vargas & Hungria (1997), podendo-se citar, por exemplo, que *B. elkanii* não possui a enzima hidrogenase, que confere maior eficiência à nitrogenase, bem como sintetiza uma substância que provoca clorose inicial das folhas, a rizobiotoxina, além de diferenças em diversas regiões gênicas.

Alguns estudos já foram conduzidos com as quatro estirpes que hoje são recomendadas comercialmente para a cultura da soja, SEMIA 587, SEMIA 5019 (=29w), SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7). Inicialmente, a análise genética por hibridização com a sequência 16S rRNA (Rumjanek et al., 1993) indicou que as estirpes SEMIAs 587 e 5019 pertenciam à espécie *B. elkanii*. A seguir, Lunge et al. (1994), pela análise de RAPD com 11 "primers" arbitrários, verificaram que cada estirpe foi posicionada em um grupo distinto, enquanto que, pela técnica de RFLP com marcadores *nif* e *nod*, as estirpes foram divididas em dois grupos distintos, SEMIA 5079-SEMIA 5080 e SEMIA 587-SEMIA 5019.

Esse agrupamento também foi confirmado por Lemos (1994), através da análise de múltiplos locos enzimáticos, sorologia, morfologia de colônia e atividade de hidrogenase e, recentemente, por Sato et al. (1999), também por RAPD com um “primer” curto de 10 pares de bases. Contudo, pela análise de diversos parâmetros morfológicos e fisiológicos, Boddey & Hungria (1997) constataram que as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5079 apresentavam características de *B. elkanii*, enquanto que a SEMIA 5080 se assemelhava à espécie *B. japonicum*.

Em relação à classificação taxonômica do rizóbio do feijoeiro, até 1984 estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (Jordan, 1984). Desde então, com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível constatar uma grande diversidade genética entre os microssimbiontes, com a definição de novas espécies e biovars: *R. tropici* tipo IIA e tipo IIB (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* bv. gallicum e *R. giardinii* bv. giardinii (Amarger et al., 1997); existem, ainda, diversas estirpes sem posição taxonômica definida, podendo representar novas espécies (Eardly et al., 1995). A designação de biovars refere-se aos plasmídeos simbióticos em um único tipo de cromossomo e, na espécie *R. etli*, inicialmente foram propostos dois biovars, phaseoli e viciae (Segovia et al., 1993) mas, pelo número pequeno de isolados de viciae analisados, o subcomitê de taxonomia indeferiu os biovars (Martínez-Romero & Jarvis, 1993). Recentemente, porém, um novo biovar para *R. etli* foi definido, mimosae (Wang et al., 1999) e, portanto, a espécie deve apresentar, agora, dois biovars.

Para a cultura do feijoeiro são recomendadas, atualmente, duas estirpes, a SEMIA 4077 (= CIAT 899) e a SEMIA 4080 (= PRF 81), esta última isolada de um solo do Paraná e recomendada desde 1998, tendo comprovado alta capacidade de fixação de N₂ em diversos ensaios conduzidos no Brasil (Hungria et al., 1999, 2000). A SEMIA 4077 é a estirpe padrão da espécie *R. tropici* e pertence

ao tipo IIB (Martínez-Romero et al., 1991) e a SEMIA 4080 apresenta propriedades intermediárias entre os tipos IIA e IIB (Hungria et al., 1999, 2000), mas sua posição taxonômica exata ainda precisa ser definida.

Informações genéticas sobre os rizóbios que são recomendados comercialmente são necessárias e devem constar nos bancos mundiais de genes. Neste trabalho, portanto, as sequências parciais do 16S rRNA e a posição taxonômica das estirpes comerciais recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro foram determinadas.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1 Estirpes utilizadas

Para a cultura da soja foram utilizadas as quatro estirpes recomendadas comercialmente, SEMIA 5019, SEMIA 587, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e as estirpes SEMIA 566 e SEMIA 586 (= CB 1809, = USDA 136b, = TAL 379), recebidas do banco de germoplasma de rizóbio da FEPAGRO (Fundação de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS). Como estirpes de referência foram utilizadas *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T (= ATCC 10324, = 3I1b6, = RCR 3425; type strain, estirpe padrão para a espécie), USDA 110 (= 3I1b110, = TAL 102, = RCR 3427, = 61A89) e USDA 123; *B. elkanii* USDA 76^T, USDA 31 e USDA 94, todas provenientes do USDA, Beltsville, MD, EUA. Para o feijoeiro foram utilizadas as duas estirpes recomendadas comercialmente, *R. tropici* IIB SEMIA 4077^T (= CIAT 899, = UMR 1899, = USDA 9030, = TAL 1797, = HAMB1 1163, = ATCC 49672), recebida do CFN, Cuernavaca, México e as estirpes SEMIA 4080 (= PRF 81), PRF 35 e PRF 54, provenientes do banco de rizóbio da Embrapa Soja. Como estirpes de referência,

foram utilizadas *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli estirpe USDA 2671 (=RCR 3644), recebida do USDA, *R. tropici* IIA CFN 299 (=USDA 9039, =LMG 9517) e *R. etli* CFN 42^T (=USDA 9032), do CFN; *R. giardinii* bv. giardinii estirpe H152^T e *R. gallicum* bv. gallicum estirpe R602^T foram recebidas do INRA, Dijon, França.

2 Perfil de RFLP-PCR da região do 16S rRNA

Após a extração do DNA das bactérias, procedeu-se à amplificação do mesmo pela técnica de PCR com os primers Y1 (5' - TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC - 3') (Young et al., 1991) e Y3 (5' - CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT - 3'') (J.P.W. Young, comunicação pessoal), que amplificam, aproximadamente, 1500 pb, codificando quase todo o 16S rRNA. O sistema para reação de amplificação foi realizado com cinco repetições em uma mistura com volume final de 50 µl, constituída por: 38,30 µl de água milli-Q estéril; 2,0 µl de dNTPs (1,5 mM de cada); 5,0 µl de tampão 10 X; 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µl de cada "primer" (Y1 e Y3, na concentração de 10 pmol/µl); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl); 2,0 µl de DNA da amostra (50 ng). O ciclo para a amplificação de Y1 e Y3 foi o recomendado por Young et al. (1991), com um incremento de 2°C na temperatura de anelamento, consistindo de: 1 ciclo de desnaturação inicial a 93°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação (45 segundos a 93°C), anelamento (45 segundos a 64°C) e extensão (2 minutos a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos; manutenção a 4°C. Foi utilizada, então, a metodologia de Laguerre et al. (1996) para o RFLP, com enzimas que reconhecem 4 ou 5 pares de base. O produto da amplificação com Y1 e Y3 foi digerido com as enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII*, *Hinfl*, *MspI*, *NdeI* e *RsaI* e, para as estirpes do feijoeiro, não foi utilizada a enzima *HaeIII*. Para cada enzima, foi preparada uma mistura contendo: 6 µl do produto do PCR; 1 µl do tampão específico para cada enzima (10X); 0,5 µl da enzima (5 U/reação) e 2,5 µl de

água milli-Q estéril. Para a *Ndell*, a mistura incluiu 1 µl da enzima; 1 µl de DTT (10 mM); 6 µl do produto de PCR; 1 µl do tampão e 1 µl de água. As misturas foram incubadas durante a noite em banho maria a 37°C. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel de eletroforese horizontal (17 X 11 cm) com 3% de agarose, em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris-base, 2,75 g de ácido bórico, 2 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução) e corridos a 100 V por 4 h. As bandas foram visualizadas, após corar com brometo de etídio, em um transluminador com lâmpada ultravioleta de comprimento de onda curta e os géis foram fotografados. Os resultados foram analisados utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) e o método de agrupamento UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Mean Average”, método de agrupamento de médias aritméticas), com o coeficiente de Jaccard.

3 Determinação da sequência parcial da região gênica do 16S rRNA

Para a soja, foram sequenciadas as quatro estirpes comerciais e as estirpes de referência USDA 31, USDA 123, SEMIA 566 e SEMIA 586. Para o feijoeiro, foram sequenciadas as estirpes SEMIA 4080 e as PRF 35 e PRF 54, também isoladas de solos do Paraná (Hungria et al., 1999, 2000). As estirpes foram submetidas ao sequenciamento direto dos fragmentos de DNA obtidos pela amplificação com os “primers” Y1 e Y3, conforme descrito no item anterior. Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando o kit “Concert Rapid PCR Purification System” (Gibco BRL) e foram quantificados. Os fragmentos de PCR (70 ng para Y1 e 40 ng para Y2) foram amplificados novamente utilizando os “primers” Y1 e Y2 (3,2 pmol/µl) (Young et al., 1991) e o kit “Big Dye” (Applied Biosystem), de acordo com as instruções do protocolo. Foram utilizados os seguintes ciclos para a amplificação: 95°C por 2 min; 30

ciclos de desnaturação a 96°C por 10 s, anelamento a 50°C por 5 s; extensão a 60°C por 4 min. Os produtos de extensão foram precipitados com 80 µl de isopropanol a 75%, homogeneizados, deixados à temperatura ambiente por 15 min e centrifugados a 12.000 rpm por 20 min a 25°C. O sobrenadante foi completamente removido, adicionaram-se 250 µl de isopropanol 75%, procedendo-se à mistura em um vórtex. Cada amostra foi centrifugada novamente por 10 min, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e, então, aquecido a 90°C por 1 min, para evaporar o restante do sobrenadante. As amostras foram ressuspensas em 8 µl de tampão (formamida e azul de dextran, 5:1, v:v) e aquecida por 2 min a 94°C, seguindo-se um choque térmico em gelo. Para o sequenciamento, 2 µl de cada amostra foram aplicados em um gel de poliacrilamida (Long Ranger Singel Packs, Produtos FMC), e as sequências foram determinadas em um sequenciador ABI 377 da Perkin Elmer. As estirpes USDA 6, USDA 76, USDA 94 e USDA 110 foram sequenciadas como tratamentos controle. As sequências que foram confirmadas na direção 3´ e 5´ foram submetidas ao “GenBank database”, para buscar alinhamentos significativos. Para a análise filogenética, as sequências obtidas neste trabalho foram alinhadas com as sequências das seguintes estirpes, obtidas no banco de germoplasma (número de acesso entre parênteses): *B. japonicum* USDA 6^T (U69638.2), USDA 110 (Z35330), USDA 136 (L23331); *B. elkanii* USDA 76^T (U35000.2), USDA 94 (D13429); *R. leguminosarum* bv. phaseoli ATCC 8002 (M55494); *R. tropici* IIA LMG 9518 (X67233.1); *R. etli* CFN 42^T (M64317); *R. tropici* IIB CIAT 899^T (U89832), *R. gallicum* bv. gallicum R602sp^T (U86343) e *R. giardinii* bv. giardinii H152^T (U86344). A análise foi realizada usando o algoritmo de UPGMA e o programa Bionumerics.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando as estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja foram submetidas à análise de RFLP-PCR da região gênica correspondente ao 16S rRNA, foram observados três agrupamentos, com um nível de similaridade de 34,8% (Fig. 1). No primeiro grupo, posicionaram-se as estirpes de *B. japonicum* USDAs 6, 110 e 123 e esta última apresentou perfis idênticos ao da SEMIA 5079; o grupo apresentou similaridade de 77,8%. As três estirpes representativas da espécie *B. elkanii* e a SEMIA 587 apresentaram similaridade de 74,1%, formando o segundo grupo. A SEMIA 5019 e a SEMIA 5080 apresentaram diversidade genética elevada em relação às demais estirpes, com nível de similaridade, entre si, de 64,9% (Fig. 1).

Somente as bases confirmadas sem nenhum erro de leitura foram consideradas e, portanto, o comprimento das sequências das estirpes analisadas variou de 469 a 648 pares de bases (pb). As sequências das quatro estirpes comerciais para a cultura da soja foram depositadas no banco mundial de genes (GenBank database) e receberam os seguintes números de acesso: SEMIA 587 (AF234890), SEMIA 5019 (AF237422), SEMIA 5079 (AF234888) e SEMIA 5080 (AF234889). As estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, USDA 123 e USDA 31 também foram sequenciadas e submetidas ao GenBank e receberam os números de acesso AF236086 a AF236089, respectivamente.

Quando as sequências das quatro estirpes comerciais foram submetidas ao GenBank para verificar alinhamentos significativos, constatou-se que a SEMIA 587 mostrou 100% de identidade (469 pb em 469 bp) com *Bradyrhizobium* sp. estirpe LMG 9520 (X70402), isolada de *Acacia albida* (X70402) e de 99% (468/469 bp) com *B. elkanii* USDA 76^T (U35000). Já a estirpe SEMIA 5019 mostrou 99% de identidade com *B. elkanii* USDA 31 (M55487) e, também, com a estirpe LMG 9520, enquanto a SEMIA 5080 mostrou 99%

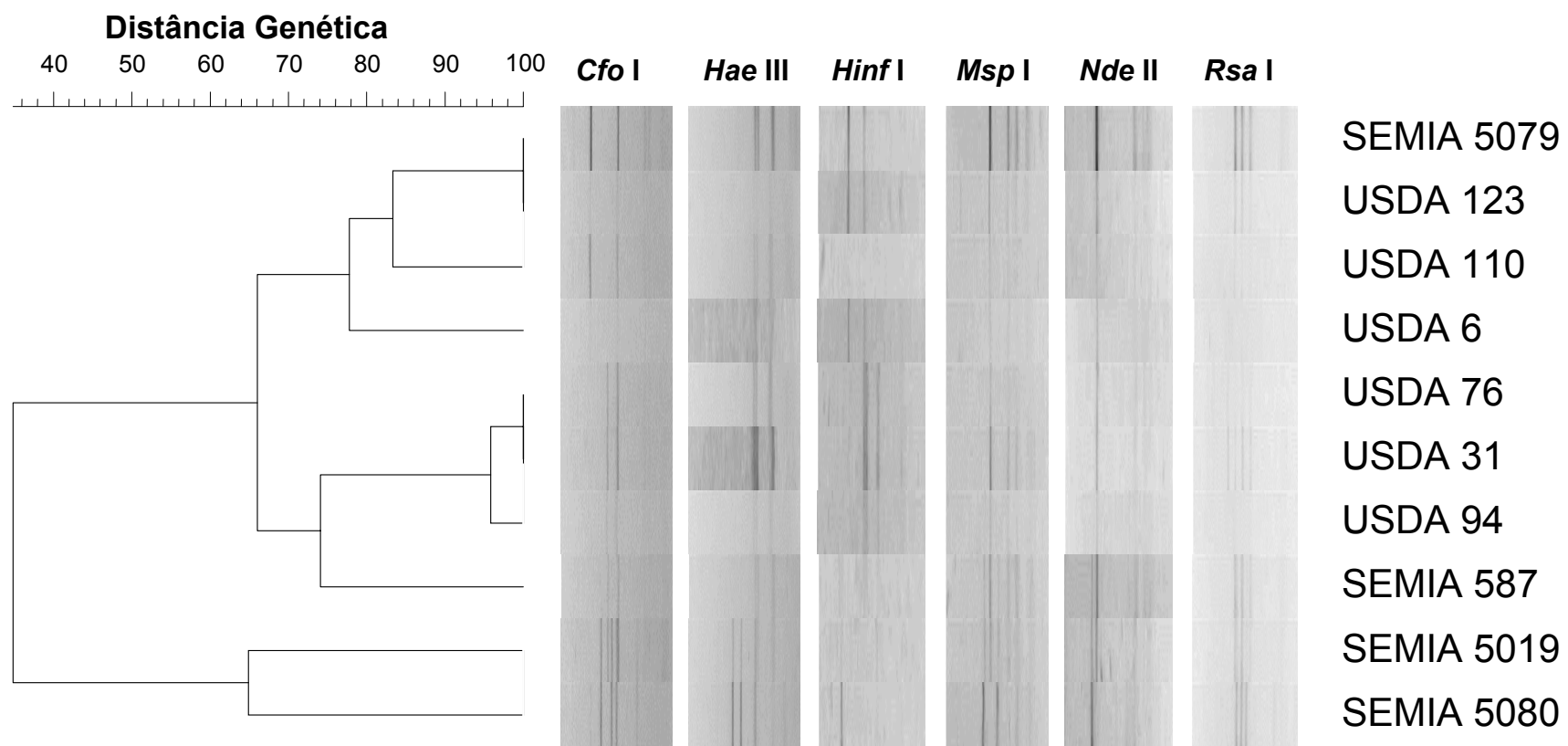


FIG. 1. Dendrograma genético das estirpes recomendadas comercialmente para a cultura da soja (SEMIA) e das estirpes representativas das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* (USDA) após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos por RFLP-PCR da região correspondente ao 16S rRNA, usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

de identidade (569/572 pb) com as estirpes de *B. japonicum* DMS 30131 T (X87272) e USDA 110 (L23330). Finalmente, a SEMIA 5079 apresentou 99% de identidade (645/646 pb) com as estirpes de *B. japonicum* USDA 6^T (U69638.2), LMG 6138 (X66024) e IAM12608 (D12781).

As relações filogenéticas das quatro estirpes comerciais com algumas estirpes utilizadas como referência podem ser visualizadas na Fig. 2, podendo-se constatar que as duas espécies de *Bradyrhizobium* formaram dois grupos distintos. As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 foram agrupadas com as estirpes referência de *B. elkanii*, todas apresentando uma relação genética de 98,8%. No segundo grupo, posicionaram-se as estirpes representativas da espécie *B. japonicum* e as SEMIAs 5079 e 5080, também unidas ao nível de 98,8%. Houve similaridade total entre as sequências dos pares de estirpes SEMIA 566-SEMIA 5079 e SEMIA 586-SEMIA 5080, confirmando que as duas estirpes atualmente recomendadas, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 são variantes obtidas a partir das estirpes SEMIA 566 e SEMIA 586, respectivamente, obtidas pelos métodos de seleção que fazem parte do programa da Embrapa Cerrados (Vargas et al., 1992). Embora apresentando a mesma sequência de bases dessa região cromossômica conservada, porém, as estirpes variantes diferem de suas parentais em diversas propriedades morfológicas, fisiológicas, genéticas e simbióticas (Nishi et al., 1996; Boddey & Hungria, 1997; Hungria et al., 1996, 1998; Vargas & Hungria, 1997). Contudo, as sequências das SEMIAs 586 e 5080 diferiram da obtida para a USDA 136, que seria a CB 1809 (Sato et al., 1999), enviada dos EUA para a Austrália e, então, para o Brasil, em 1966, onde recebeu a denominação de SEMIA 586 (Vargas & Hungria, 1997; Santos et al., 1999). Já as SEMIAs 566 e 5079 apresentaram sequências idênticas às da USDA 123, estirpe altamente competitiva e dominante nos solos do meio-oeste dos EUA (Schmidt et al., 1986).

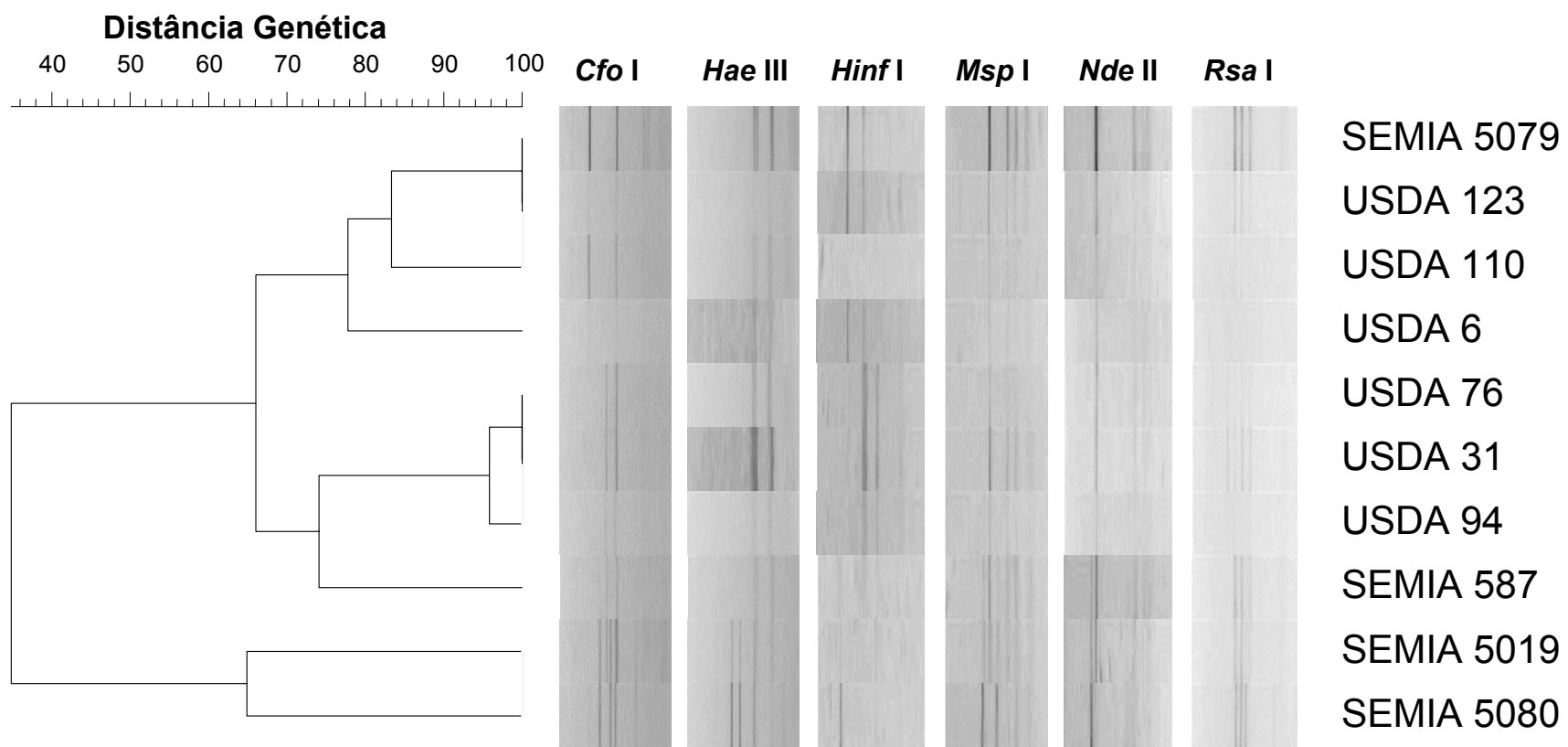


FIG. 1. Dendrograma genético das estirpes recomendadas comercialmente para a cultura da soja (SEMIA) e das estirpes representativas das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* (USDA) após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos por RFLP-PCR da região correspondente ao 16S rRNA, usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

O gênero *Bradyrhizobium* apresenta pouca variabilidade genética, dificultando a separação das espécies. Assim, embora o RFLP-PCR da região 16S rRNA tenha possibilitado a separação de diversas espécies de rizóbio (Laguerre et al., 1992, 1994, 1996, 1997; Terefework et al., 1998), essa metodologia nem sempre é capaz de diferenciar espécies estreitamente relacionadas (Laguerre et al., 1994), como foi o caso das estirpes de *Bradyrhizobium* deste estudo, mesmo utilizando duas enzimas de restrição a mais do que o recomendado por Laguerre et al. (1994). Pela PCR com “primers” curtos ou específicos, a divisão das quatro estirpes nas duas espécies de *Bradyrhizobium* também não foi clara (Bangel, 2000). Já pelo sequenciamento parcial da região que codifica o 16S rRNA, as duas espécies de *Bradyrhizobium* formaram dois grupos distintos, que permitiram definir que as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 pertencem à espécie *B. elkanii*, enquanto as SEMIA 5079 e SEMIA 5080 à espécie *B. japonicum*. Anteriormente, pela análise de diversos parâmetros morfológicos e fisiológicos, Boddey & Hungria (1997) constataram que a estirpe SEMIA 5079 apresentava características de *B. elkanii*, contudo, neste trabalho, pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA, que seria o método mais avançado taxonomicamente, essa estirpe apresentou maior identidade com *B. japonicum*. Esses resultados indicam que diversas propriedades fisiológicas, consideradas típicas de uma espécie, nem sempre correspondem à análise molecular; além disso, existem estirpes que apresentam propriedades mistas entre as duas espécies, conforme relatado por Boddey & Hungria (1997), indicando que, para a definição precisa das espécies, é necessário recorrer ao sequenciamento do 16S rRNA.

Em relação às estirpes recomendadas para a cultura do feijoeiro, pela análise de RFLP-PCR, as espécies *R. gallicum* e *R. giardinii* foram unidas ao nível de 63,4% de similaridade e a estirpe isolada de um solo do Paraná, PRF 35, ficou posicionada entre essas duas espécies; *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* apresentou 54,3% de similaridade com esse grupo (Fig. 3). A nova estirpe recomendada

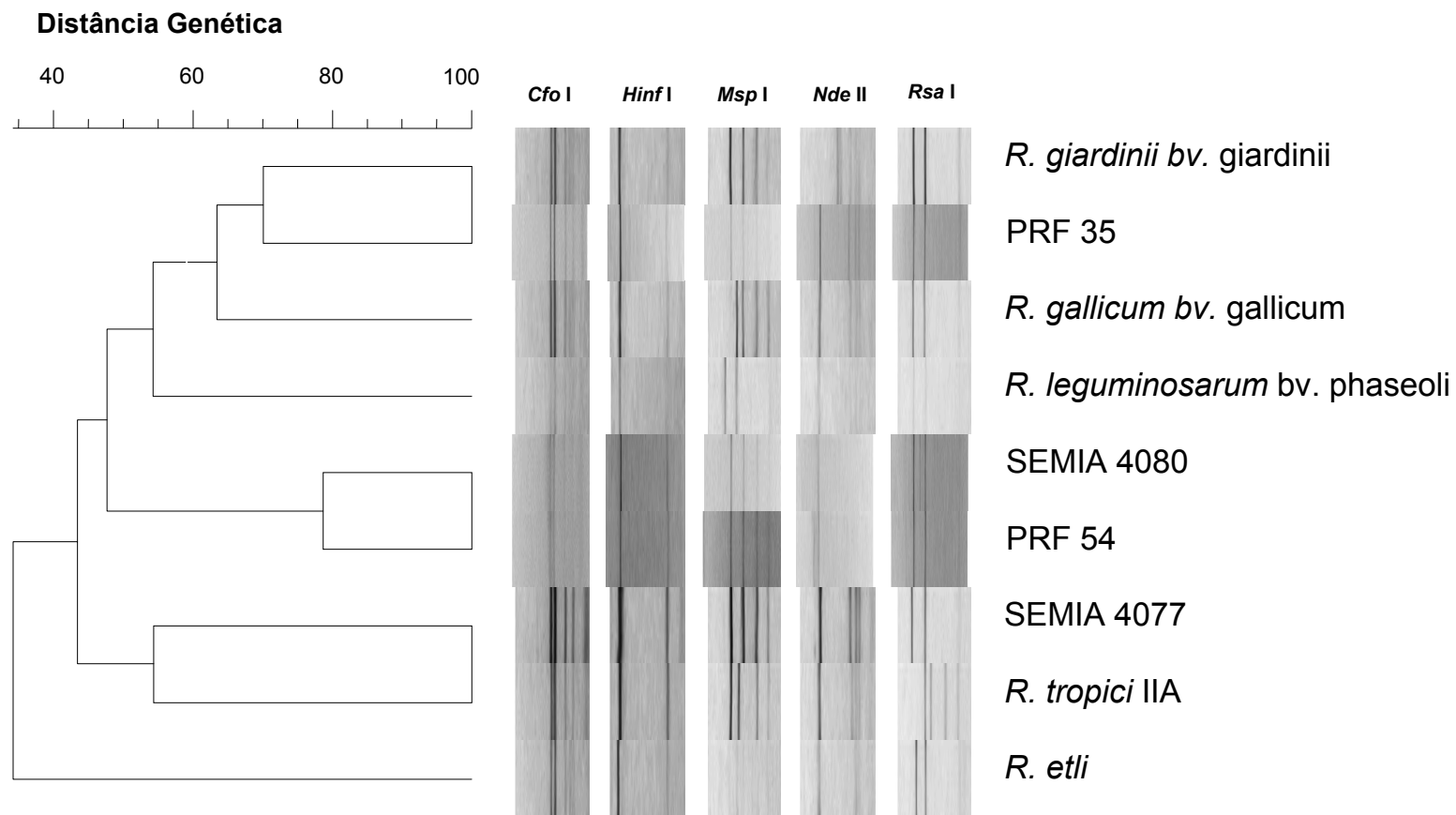


FIG. 3. Dendrograma genético das estirpes SEMIA recomendadas para a cultura do feijoeiro e das estirpes representativas das espécies *Rhizobium* capazes de nodular essa leguminosa, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos por RFLP-PCR da região correspondente ao 16S rRNA, usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

comercialmente para a cultura, a SEMIA 4080, apresentou similaridade elevada, de 78,7%, com outra estirpe eficiente e também isolada do Paraná, a PRF 54. Essas duas estirpes, bem como a PRF 35, apresentaram composição de ácidos graxos e perfil de fatores de nodulação (fatores Nod) característicos da espécie *R. tropici*, com propriedades morfológicas e fisiológicas intermediárias entre os tipos IIA e IIB (Hungria et al., 1999, 2000). Neste trabalho, porém, a estirpe de *R. tropici* IIB SEMIA 4077, recomendada comercialmente, e *R. tropici* IIA CFN 299 apresentaram 54,4% de similaridade entre si, mas baixa relação genética com todas as estirpes do Paraná. Finalmente, *R. etli* apresentou similaridade de 34,2% com as demais estirpes (Fig. 3).

As sequências das estirpes SEMIA 4080, PRF 54 e PRF 35 foram submetidas ao GenBank, recebendo os números de acesso AF260274, AF260275 e AF260298, respectivamente. A estirpe PRF 35 apresentou 99% de identidade (464/466 pb) com diversas estirpes de *Rhizobium*, incluindo a estirpe ACCC 19667 (AF041443.1), isolada de *Amorpha fruticosa*, diversas estirpes de *R. leguminosarum*, por exemplo, USDA 2449, do biovar *viciae* (U89828.1) e mesmo com *Agrobacterium* (D12788). A estirpe PRF 54 também apresentou 99% de identidade com as mesmas estirpes; as duas estirpes paranaenses diferiram, entre si, em apenas uma base, um G na PRF 35 no local de um T na PRF 54 na posição 94. Já a PRF 81 apresentou 99% de identidade (599/600 pb) com *Rhizobium* espécie genômica Q estirpe BDV5102 (Z94806.1), isolada de arbustos nativos na Austrália (Lafay & Burdon, 1998), com *R. leguminosarum* LMG 9518 (X67233.1), estirpe atualmente reclassificada como *R. tropici* IIA (Amarger et al., 1997), *R. tropici* estirpe IAM 14206 (D12798.1) e *Agrobacterium tumefaciens* K-Ag-3 (D14504.1).

Pela análise filogenética, constatou-se grande similaridade entre as estirpes paranaenses PRF 35 e PRF 54 (Fig. 4), confirmando semelhança nos perfis de DNA amplificados com os “primers” ERIC

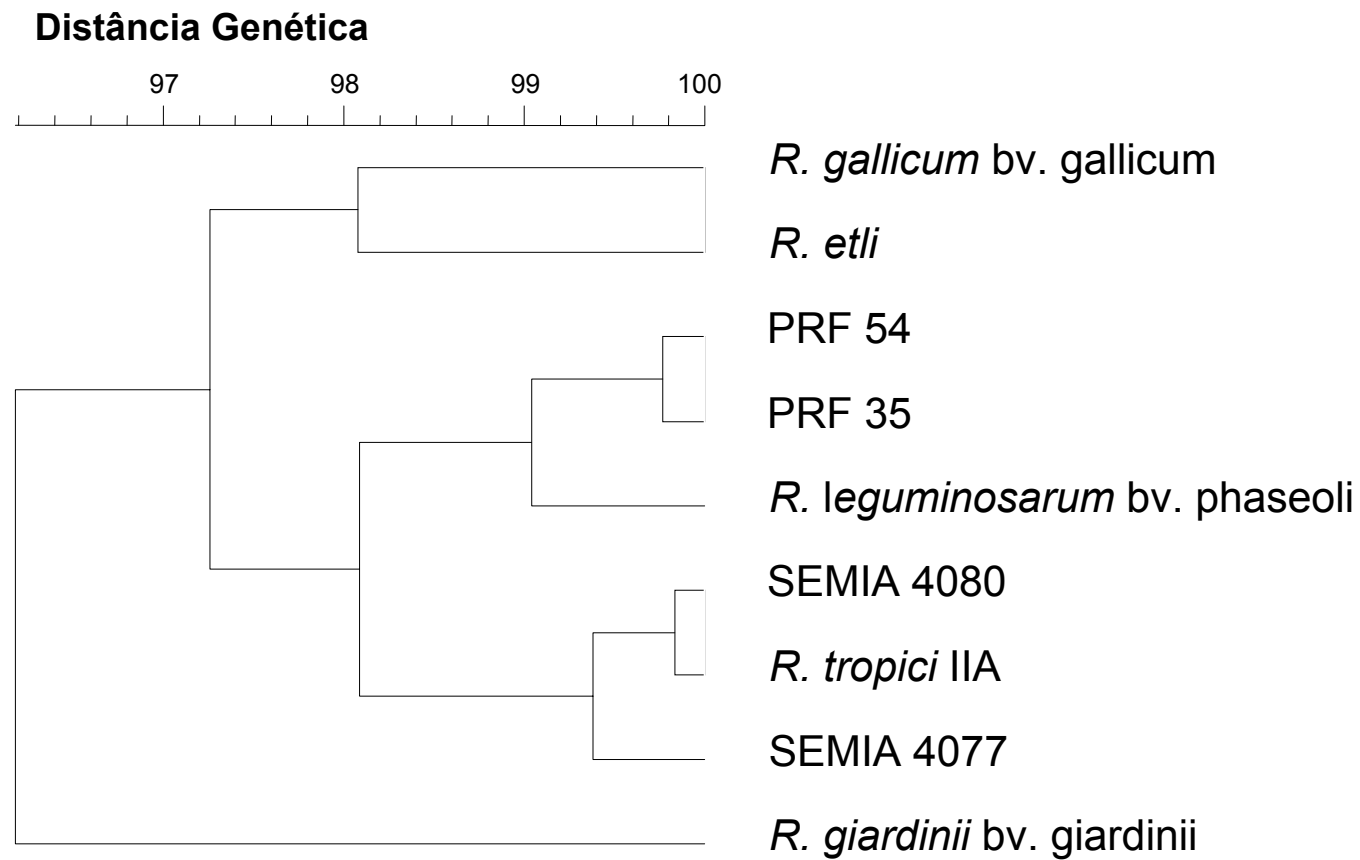


FIG. 4. Dendrograma (UPGMA) mostrando as relações genéticas entre os genes 16S rRNA das estirpes SEMIA recomendadas para a cultura do feijoeiro e das estirpes representativas das espécies *Rhizobium* capazes de nodular essa leguminosa. Os números de acesso do "GenBank" estão listados no material e métodos.

e REP e por RAPD constatada anteriormente (Hungria et al., 2000). Essas estirpes, porém, apresentaram maior relação genética, de 99%, com *R. leguminosarum* bv phaseoli (Fig. 4), embora, em diversas análises morfológicas, fisiológicas e genéticas, tenham mostrado características típicas de *R. tropici* (Hungria et al., 1999, 2000). Já a estirpe comercial SEMIA 4080 foi relacionada a *R. tropici* IIA em 99,8% e à outra estirpe comercial, *R. tropici* IIB SEMIA 4077, em 99,4% (Fig. 4).

Para as estirpes do feijoeiro, a análise de RFLP-PCR também não permitiu a definição clara das espécies. Conforme salientado por Laguerre et al. (1994), algumas espécies e mesmo gêneros estreitamente relacionados, como é o caso de *R. tropici* e *Agrobacterium*, não podem ser diferenciados por essa técnica. Pelo sequenciamento parcial da região correspondente ao 16S rRNA, porém, foi possível definir que as duas estirpes recomendadas atualmente para a cultura do feijoeiro pertencem à espécie *R. tropici*.

Neste trabalho foram, portanto, definidas as espécies das estirpes recomendadas comercialmente para as culturas da soja e do feijoeiro e as sequências parciais do 16S rRNA agora estão depositadas no banco mundial de genes. Quanto ao reconhecimento de cada uma das estirpes comerciais, de grande importância para o controle dos inoculantes que, obrigatoriamente, devem carregar exclusivamente essas estirpes, perfis distintos para cada uma das estirpes da soja foram obtidos pelas análises de lipopolissacarídeos (Chueire et al., 1999; Bangel, 2000) e de DNA após a amplificação com os "primers" específicos ERIC, REP (Chueire et al., 1999) e BOX (Bangel, 2000) ou com alguns "primers" curtos e aleatórios já identificados (Chueire et al., 1999; Sato et al., 1999; Bangel, 2000). Essas mesmas técnicas conseguem diferenciar as estirpes recomendadas para a cultura do feijoeiro (Hungria et al., 2000).

IV. AGRADECIMENTOS

Pesquisa financiada pela FINEP/CNPq/MICT, Programa de Grupos de Excelência, PRONEX (41.96.0884.00); os estudos com o feijoeiro são também financiados pelo projeto EC-INCO (ERBIC18CT980321). L. M. de O. Chueire e M. Hungria são bolsistas do CNPq (520396/96-0).

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.996-1006, 1997.
- BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. Porto Alegre: UFRGS/FA, 2000. 115p. Tese de mestrado.
- BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.25, p.407-415, 1997.
- BUCHANAN, R.E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN, V.B.D.; McGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.225-240, 1980.
- CHUEIRE, L.M.O.; NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética, fisiológica e bioquímica de estirpes de *Bradyrhizobium* para a cultura da soja isoladas de solos da Região Sul e do Cerrado com maior eficiência de fixação do nitrogênio e capacidade competitiva. In: EMBRAPA SOJA (Londrina, PR). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja, 1998**. Londrina, 1999. p.51-53. (Embrapa Soja. Documentos, 125).

- de BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.
- EARDLY, B.D.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.507-512, 1995.
- FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932. 343p.
- HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; MEGÍAS, M. Characterization of new efficient and competitive strains for the bean crop (*Phaseolus vulgaris* L.) crop in Brazil. In: MARTÍNEZ, E.; HERNÁNDEZ, G., eds. **Highlights of Nitrogen fixation research**. New York: Plenum Press, 1999. p.251-254.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford (no prelo).
- HUNGRIA, M.; BODDEY, L.H.; SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.393-399, 1998.
- HUNGRIA, M.; NISHI, C.Y.M.; COHN, J.; STACEY, G. Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin nodulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N_2 fixation rates. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, p.331-341, 1996.

- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.189-295.
- JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, London: Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.
- JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M., SADOWSKY, M.J.; de BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- LAFAY, B.; BURDON, J.J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.3989-3997, 1998.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2029-2036, 1996.

- LAGUERRE, G.; MAZURIER, S.I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v.101, p.17-26, 1992.
- LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4748-4758, 1997.
- LEMOS, E.G.M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade da hidrogenase**. Jaboticabal: UNESP/FCAV, 1994. 108p. Tese de Livre-Docência.
- LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; HIRIGOYEN, D.; STOLL, M.; BONATTO, S.; OZAKI, L.S. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Philadelphia, v.10, p.648-652, 1994.
- MADRZAK, C.J.; GOLINSKA, B.; KRÓLICZAK, J.; PUDELKO, K.; LAZEWSKA, D.; LAMPKA, B.; SADOWSKY, M. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1194-1200, 1995.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M., FRANCO; A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; JARVIS, B.D.W. International committee on systematic bacteriology, subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*, minutes of the meeting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.622, 1993.
- McINROY, S.G.; CAMPBELL, C.D; HAUKKA, K.; ODEE, D.W.; SPRENT, J.I.; WANG, W.J.; YOUNG, J.P.W.; SUTHERLAND, J.M.

Characterisation of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using Biolog™ and partial 16S rRNA sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.170, p.111-117, 1999.

NISHI, C.Y.M.; BODDEY, L.H.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. **Symbiosis**, Philadelphia, v.20, p.147-162, 1996.

OYAIZU, H.; NARUHASHI, N.; GAMOU, T. Molecular methods of analysing bacterial diversity: the case of rhizobia. **Biodiversity and Conservation**, New York, v.1, p.237-249, 1992.

RICHARDSON, A.E.; VICCARS, L.A.A.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.515-524, 1995.

ROSSUM, D. van ; SCHUURMANS, F.P.; GILLIS, M.; MUYOTCHA, A.; van VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOGERD, F.C. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1599-1609, 1995.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; BERKUM, P. van; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.4371-4373, 1993.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, E.T.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, p.487-491, 1988.

SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.30, p.261-272, 1999.

SATO, M.L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.; van BERKUM, P. Verification of strain identity in Brazilian soybean inoculants by using the polymerase chain

- reaction. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Philadelphia, v.15, p.387-391, 1999.
- SCHMIDT, E.L.; ZIDWICK, M.J.; ABEBE, H.H. *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 and diversity among member isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.1212-1215, 1986.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.374-377, 1993.
- SEGUNDO, E.; MARTINEZ-ABARCA, F.; DILLEWIJN, P. van; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; LAGARES, A.; MARTINEZ-DRETS, G.; NIEHAUS, K.; PUHLER, A.; TORO, N.; van KILLEWIJN, P. Characterization of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.28, p.169-176, 1999.
- SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.79, p.425-431, 1995.
- TEREFEWORK, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.349-356, 1998.
- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.D.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. **Dois novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 3p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 62).
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.6823-6831, 1991.

- VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).
- WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SANTOS, A.G.; MARTÍNEZ-ROMERO, J., CEVALLOZ, M.A., MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.49, p.1479-1491, 1999.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.697-703, 1991.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.305-313, 1993.
- WOESE, C.R. Bacteria evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, v.51, p.221-271, 1987.
- YANAGI, M.; YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer.. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.107, p.115-120, 1993.
- YOUNG, C.C.; CHEN, K.T. Genetic diversity of fast- and slow-growing soybean rhizobia determined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.26, p.2544-256, 1998.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.73, p.2271-2277, 1991.